

学校编码：10384

分类号_____密级

学号：24520091152955

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

心磷脂在 T4 影响 H9c2 细胞线粒体膜
电位过程中的作用初探

The effect of T4 on Mitochondrial Membrane Potential of H9c2
cells: The role of Cardiolipin

李文哲

指导教师姓名：陈晨 教授

叶本兰 教授

专 业 名 称：生理学

论文提交日期：2012-5

论文答辩时间：2012-5

学位授予日期：2012-6

答辩委员会主席：

评 阅 人：

2012 年 6 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(心磷脂在甲亢性心脏功能变化中的作用及其钾离子调控途径的作用机制)课题(组)的研究成果,获得(国家自然科学基金 81170727 号项目)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学医学院生理学科)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

略缩语索引

| 英文缩写 | 英文全名 | 中文全名 |
|------|---|--|
| ATP | Adenosine Triphosphate | 腺嘌呤核苷三磷酸 |
| CCCP | carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone | 羰基氰化物间氯苯肼 |
| CL | Cardiolipin | 心磷脂 |
| CLSM | confocal laser scanning microscope | 激光共聚焦显微镜 |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Media | DMEM 细胞培养基 |
| DMSO | dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砷 |
| FBS | Fetal Bovine Serum | 胎牛血清 |
| FSC | Forward Scatter | 前向散射光 |
| JC-1 | 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetrethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide | 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四 乙基苯并咪唑羰花青碘 化物 |
| NAO | nonyl acridine orange | 壬基吖啶橙 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | 磷酸盐缓冲液 |
| SSC | Side Scatter | 侧向散射光 |
| T4 | levothyroxine | 四碘甲状腺氨酸 |

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

| | |
|---|----|
| 略缩语索引 | I |
| 摘 要 | V |
| Abstract | VI |
| 第一章 前言 | 1 |
| 1.1 心磷脂的结构 | 1 |
| 1.2 心磷脂与甲状腺功能紊乱 | 1 |
| 1.3 心磷脂与线粒体 | 2 |
| 1.4 研究目的和研究意义 | 3 |
| 第二章 材料与方法 | 5 |
| 2.1 实验材料 | 5 |
| 2.2 试剂与仪器 | 5 |
| 2.2.1 主要试剂 | 5 |
| 2.2.2 主要仪器 | 6 |
| 2.2.3 主要试剂配制方法 | 7 |
| 2.3 实验方法 | 9 |
| 2.3.1 甲亢动物模型的制作 | 9 |
| 2.3.2 小鼠心脏组织分离及称重 | 9 |
| 2.3.3 小鼠心脏组织冰冻切片的制作 | 9 |
| 2.3.4 组织水平心磷脂 (CL) 含量分析 | 10 |
| 2.3.5 细胞培养 | 11 |
| 2.3.6 流式细胞术检测 H9c2 细胞线粒体膜电位(Ψ_m) | 12 |
| 2.3.7 细胞水平心磷脂 (CL) 含量分析 | 12 |
| 2.4 统计分析 | 13 |
| 第三章 结果 | 14 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1 T4 对小鼠体重及心重的影响..... | 14 |
| 3.2 T4 对心磷脂含量的影响..... | 14 |
| 3.2.1 T4 对小鼠心脏组织心磷脂含量的影响 | 14 |
| 3.2.2 T4 对 H9c2 细胞心磷脂含量的影响..... | 15 |
| 3.3 T4 对 H9c2 细胞线粒体膜电位(Ψ_m)的影响..... | 17 |
| 3.4 心磷脂对 H9c2 细胞线粒体膜电位(Ψ_m)的影响 | 19 |
| 3.4.1 不饱和心磷脂 (18:1) 对 H9c2 细胞线粒体膜电位(Ψ_m)的影响 | 19 |
| 3.4.2 饱和心磷脂 (14:0) 对 H9c2 细胞线粒体膜电位(Ψ_m)的影响 | 22 |
| 3.4.3 不饱和心磷脂 (18:1) 与饱和心磷脂 (14:0) 对 H9c2 细胞线粒体膜 电位(Ψ_m)的影响比较 | 24 |
| 第四章 讨论..... | 27 |
| 4.1 T4 对小鼠体重及心重的影响..... | 27 |
| 4.2 T4 对心磷脂含量的影响..... | 28 |
| 4.3 T4 对细胞线粒体膜电位的影响..... | 28 |
| 4.4 外源心磷脂对 H9c2 细胞线粒体膜电位的影响 | 28 |
| 结 论..... | 30 |
| 文献综述..... | 31 |
| 参考文献..... | 39 |
| 致 谢..... | 47 |

CONTENTS

| | |
|--|-----|
| Abbreviation | I |
| Abstract in Chinese | VI |
| Abstract in English | VII |
| Chapter 1 Introduction | 1 |
| 1.1 The structure of CL | 1 |
| 1.2 CL and thyroid dysfunction | 1 |
| 1.3 CL and mitochondria | 2 |
| 1.4 Purpose and research significance of thesis | 3 |
| Chapter 2 Materials and methods | 5 |
| 2.1 Materials | 5 |
| 2.2 Reagents and experiment instruments | 5 |
| 2.3 Methods | 9 |
| 2.4 Statistical analysis | 13 |
| Chapter 3 Results | 14 |
| 3.1 The effect of T4 on heart mass and body mass of mice | 14 |
| 3.2 The effect of T4 on CL content | 14 |
| 3.3 The effect of T4 on mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) of H9c2 cells | 17 |
| 3.4 The effect of CL on mitochondrial membrane potential of H9c2 cells | 19 |
| Chapter 4 Discussion | 27 |
| 4.1 The effect of T4 on body and heart weight of mice | 27 |
| 4.2 The effect of T4 on CL content | 28 |
| 4.3 The effect of T4 on mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) of H9c2 cells | 28 |
| 4.4 The effect of exogenous CL on mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) of H9c2 cells | 28 |

| | |
|------------------------------|-----------|
| Conclusion | 30 |
| Article Review | 31 |
| Reference | 39 |
| Acknowledgement | 47 |

厦门大学博士论文摘要库

摘要

甲状腺激素过多可以直接引起心脏的形态和功能的变化，如心肌肥大，心律失常和心力衰竭等。尽管已有大量研究表明甲状腺激素对心脏功能影响显著，但其机制尚未完全阐明。甲状腺激素是线粒体生物合成、呼吸以及脂代谢的重要调节因子。甲状腺激素可以直接影响心磷脂生物合成过程中的酶进而调节心磷脂含量，提示心磷脂可能参与了甲亢性心脏功能紊乱的病理过程，是构成其病理变化机制的一部分。

本实验分别探讨了组织水平（KM 小鼠心脏组织）和细胞水平（H9c2 心肌细胞系）在高甲状腺素（T₄）环境下心磷脂含量的变化。并且，在上述研究基础上，从线粒体膜电位的角度，对心磷脂参与甲亢性心脏功能紊乱的机制进行了初步探讨。采用心磷脂特异性染料 NAO 检测心磷脂含量，H9c2 细胞线粒体膜电位用 JC-1 检测。

通过腹腔注射 T₄ 制作 KM 小鼠甲亢模型，发现甲亢组小鼠心脏重量增加了 16%。激光共聚焦显微镜检测心脏组织心磷脂含量的实验结果显示，甲亢组小鼠心脏组织心磷脂含量显著升高。流式细胞术检测 H9c2 细胞心磷脂含量实验结果显示，在 T₄ 作用下，H9c2 细胞心磷脂含量明显升高。将 H9c2 细胞在 1 μ M T₄ 环境下培养 8 天，JC-1 染色后流式检测线粒体膜电位，结果显示，T₄ 处理的细胞线粒体膜电位明显升高。分别用 5 μ M、10 μ M 饱和心磷脂（14:0）及不饱和心磷脂（18:1）处理 H9c2 细胞 24 小时，JC-1 染色后流式分析线粒体膜电位，结果显示，饱和心磷脂（14:0）与不饱和心磷脂（18:1）处理的细胞线粒体膜电位均下降，且饱和心磷脂（14:0）导致膜电位下降更明显。

综合以上实验结果得出如下结论：T₄ 能诱导 H9c2 细胞心磷脂含量增加和线粒体膜电位超极化。外源心磷脂与内源心磷脂对线粒体膜电位的作用可能不同，外源饱和心磷脂（14:0）与不饱和心磷脂（18:1）均能诱导 H9c2 细胞线粒体膜电位去极化，且饱和心磷脂（14:0）引起的去极化程度更深。

关键词：心磷脂；甲状腺激素；线粒体膜电位

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Excessive thyroid hormone induces cardiac hypertrophy and promotes heart failure in patients with hyperthyroidism, but the mechanism remains elusive. Thyroid hormone is a major regulator of mitochondrial biogenesis, respiratory function and lipid metabolism, and has been shown to directly modulate cardiolipin (CL) content by influencing the activity of CL biosynthesis enzymes, which indicated that the CL may be involved in the pathological processes of hyperthyroid cardiac dysfunction, and constitutes its pathological changes part of the mechanism.

In this study, the changes of CL content in the high thyroid hormone (T₄) environment, in the level of organization (KM mouse heart tissue) and cell (in H9c2 myocardial cell line) were researched. On the basis of that, the mechanism in which CL participated in the hyperthyroid heart dysfunction has been further studied from the perspective of mitochondrial membrane potential. the CL content was detected CL-specific dye NAO, while H9c2 cells mitochondrial membrane potential was detected by staining JC-1.

The heart weight of KM mice with hyperthyroidism, which were made by intraperitoneal injection of T₄, increased 16%. Moreover, the CL content in the hyperthyroidism mice's heart tissue was significantly higher, which was detected by LSCM. In the experiment of flow cytometry, we found the CL content in the T₄-treated cell was significant higher. H9c2 cells were cultured in the environment of 1 μ M T₄ for eight days, then stained by JC-1. Flow cytometry detected the mitochondrial membrane potential. The result showed, with T₄ treatment, that the mitochondrial membrane potential was significantly increased. H9c2 cells was treated with 5 μ M and 10 μ M saturated CL (14:0) and unsaturated CL (18:1) for 24 hours, then, stained by JC-1 and detected the mitochondrial membrane potential by flow cytometry. After treatment with saturated CL (14:0) and unsaturated CL (18:1), mitochondrial membrane potential declined, while treated with saturated CL (14:0), the potential declined more obviously.

Conclusion: T4 can increase CL content and induce mitochondrial membrane potential hyperpolarization in H9c2 cells. Exogenous CL and endogenous CL have different effects on the mitochondrial membrane potential. Exogenous saturated CL (14:0) and unsaturated CL (18:1) can both induce mitochondrial membrane potential depolarization of H9c2 cells, what's more, saturated CL (14:0) induced depolarization much deeper.

Key words: Cardiolipin; Thyroid hormonal; Mitochondrial membrane potential

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库